

A4

Method and appts. for studying rapid biological reactions**Publication number:** DE4407439**Publication date:** 1995-09-14**Inventor:** WEUSTER-BOTZ DIRK DR (DE); WANDREY
CHRISTIAN PROF (DE)**Applicant:** KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)**Classification:****- international:** C12M1/26; C12M1/26; (IPC1-7): C12M1/34; G01N33/48**- european:** C12M1/26**Application number:** DE19944407439 19940307**Priority number(s):** DE19944407439 19940307**Also published as:**

CH688414 (A5)

Report a data error here**Abstract of DE4407439**

Method for studying the progress of biological reactions over a period of time comprises consecutively removing samples whilst adding a deactivating agent to the location from which the sample was taken, using a double-tubed probe. As each sample is taken into the probe, a barrier liq. is simultaneously expelled from the same tube and at the end of the sampling period, the opt. frozen sample is divided into individual sections corresp. to each sample time. Also claimed is the appts. for carrying out the method, comprising a tubular probe coupled to a barrier liq.-contg. probe for receiving the series of samples. Use - The method is useful for monitoring rapid substance-conversion processes mediated by microorganisms, e.g. fermentation processes. Advantage - This is a low cost method of taking >1 sample per second.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



A4

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 44 07 439 A 1

51 Int. Cl.⁶:
C 12 M 1/34
G 01 N 33/48

21 Aktenzeichen: P 44 07 439.5
22 Anmeldetag: 7. 3. 94
43 Offenlegungstag: 14. 9. 95

DE 44 07 439 A 1
BEST AVAILABLE COPY

71 Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

72 Erfinder:
Weuster-Botz, Dirk, Dr., 52070 Aachen, DE;
Wandrey, Christian, Prof., 51428 Jülich, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zur Serienprobenahme biologischer Proben

57 Für die Untersuchung schnellablaufender Bioreaktionen durch rasche Aufeinanderfolge von Probenahmen aus dem Reaktionsraum eignet sich eine als Doppelrohr ausgebildete Probenahmesonde mit Inaktivierungsmittelzumischung, an die sich ein zunächst mit Sperrflüssigkeit gefülltes Probenrohr von ausreichender Länge zur Aufnahme einer Probenreihe unter Verdrängung der Sperrflüssigkeit anschließt, das nach Beendigung der Serienprobenahme - gegebenenfalls eingefroren - entsprechend der gewünschten Zeitunterteilung der Untersuchungsproben in einzelne Abschnitte zerlegt wird unter Erzielung einer im gewünschten zeitlichen Verlauf entnommenen Probenreihe. Zweckmäßig sind Absperrmittel an den Probenrohrenenden und ein pneumatischer Antrieb von Proben- und Aktivierungsmittelstrom. Zusätzlich können geringe Segmentierungsmengen einer mit den Proben nicht mischbaren Phase periodisch in das Probenrohr eingespeist werden. Die in den Reaktor einpaßbare Probenahmesonde hat zweckmäßigerweise eine zum Reaktionsraum offene Entnahmespitze, in deren Erweiterung eine insbesondere um 30° bis 60° gegen die Sondenachse geneigte Parallelbohrung für die Zufuhr von Inaktivierungsmittel mündet, wobei angrenzend an diese Einmündung statische Mischelemente in der Sonde vorgesehen sind.

DE 44 07 439 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 95 508 037/74

8/30

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufs von Bioreaktionen in einem Reaktionsraum durch aufeinanderfolgende Entnahme biologischer Proben daraus unter Zumischung von Inaktivierungsmittel am Probenahmeort mit einer als Doppelrohr ausgebildeten Probenahmesonde sowie auf eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Für die Untersuchung der Kinetik innerhalb biologischer Systeme spielt die Probenahme eine wesentliche Rolle, wobei insbesondere bei Schnellablauf instationärer Stoffwechselvorgänge in Mikroorganismen eine rasche Folge von Probenahmen in ausreichender Menge für genügend empfindliche Bestimmungen von gegebenenfalls nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Komponenten wichtig ist.

Bekannt sind unterschiedliche Probenahmetechniken wie:

1. Manuelle Probenahmetechniken:

Die klassischen Probenahmesysteme sind zur Entnahme von 2—5 Proben pro Stunde mit zwischen-geschalteter Dampfsterilisation (Probevolumen 0,01—1 l) vorgesehen. Primäres Ziel ist neben der Entnahme einer repräsentativen Probe die Vermeidung einer Kontamination des Reaktorinhalts und der gezogenen Probe. Neben dem klassischen 3-Ventil-System zur Probenahme werden auch Kolbenventil-Konstruktionen eingesetzt (Standardisierungs- und Ausrüstungsempfehlungen für Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, DECHEMA, 1991, 45—62).

2. Probenahmesysteme für die On-line-Prozeßanalytik:

Insbesondere zur Bestimmung von intrazellulären Enzymaktivitäten mit Hilfe der Fließ-Injektions-Analytik (FIA) wurden entsprechende Probenahmesysteme entwickelt. Hierbei wird die Probe mit einer Pumpe (Peristaltik- oder Kolbenpumpe) aus dem Reaktionsraum angesaugt und in einer nachgeschalteten Verdünnungs- und/oder Mischkammer mit Inaktivierungsreagenz versetzt. Hierdurch lassen sich Inaktivierungszeiten von 5 Sekunden erreichen (Spohn, U.; Voss, H.: Probenahmesysteme für die online-Prozeßanalytik in der Sterilfermentation. Jahrbuch Biotechnologie, Carl Hanser Verlag München Wien 1992, 227—253).

3. Koaxialkatheter:

Zur kontinuierlichen Probenahme wird ein Koaxialkatheter vorgeschlagen, bei dem die Probe im Zentralrohr abgesaugt und Inaktivierungsreagenz im Sekundärrohr zugeführt wird, so daß direkt ab der Probenahmestelle eine Inaktivierung der Probe erfolgen kann, bevor in einer nachgeschalteten Dialysezelle Zellmasse und höhermolekulare Substanzen abgetrennt werden (Holst et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 (1988) 32—36).

4. Schnelle Probenahme mit Ventiltechnik und Probensammler:

Über eine HPLC-Kapillare wird die Probe pneumatisch aus dem Reaktor gefördert und über ein Ventil einem Probensammler zugeführt. Die Probe wird in evakuierte Glasröhrchen injiziert, die 35% Perchlorsäurelösung enthalten, die auf -25°C vorgekühlt ist. Damit läßt sich eine Probenfrequenz von maximal 0,5/Sekunde erreichen (Theobald, U.; Baltes, M.; Rizzi, M.; Reuss, M.: Biochemical Engi-

Keine dieser bekannten Probenahmetechniken ist für Probenahmefrequenzen von mehr als 1/sec geeignet.

Ziel der Erfindung ist daher eine Probenahme, bei der mit relativ geringem Aufwand hohe Probenahmefrequenzen erreicht werden können, wobei vorzugsweise Probemengen je Untersuchungspunkt angestrebt werden, die eine Untersuchung zellinterner Komponenten gestatten.

Das zu diesem Zweck entwickelte erfindungsgemäße Verfahren der eingangs genannten Art ist dadurch gekennzeichnet, daß man die aufeinanderfolgenden Proben in zumindest ein mit Sperrflüssigkeit gefülltes Probenrohr von ausreichender Länge zur Aufnahme der Probenserie unter Verdrängung der Sperrflüssigkeit schickt, das (bzw. dessen Inhalt) nach Beendigung der Serienprobenahme — ggf. eingefroren — entsprechend der gewünschten Zeitunterteilung der Untersuchungsproben in einzelne Abschnitte zerteilt wird.

Weitere Besonderheiten des Verfahrens ergeben sich aus den Ansprüchen 2 bis 4.

Gemäß der Erfindung wird eine Serienprobenahme mit hohen Meßfrequenzen (je nach Unterteilung bis zu 100/sec) in reproduzierbarer Weise ermöglicht, wobei der apparative Aufwand relativ gering bleibt, jedoch durch Berücksichtigung innerer Standards hohe Genauigkeiten erzielt werden und bei entsprechend hoher Probenahmemenge selbst zellinterne Komponenten in ihrer zeitlichen Änderung analysiert werden können.

Die Erfindung ist damit besonders geeignet für die biotechnologische Forschung, um schnelle komplexe Reaktionen unter definierten Bedingungen im Bioreaktor verfolgen zu können. Diese Möglichkeiten wirken sich auf die Bioverfahrenstechnik zur Ermittlung kurzzeitiger Einflüsse lokaler Konzentrationsgradienten auf den Stoffwechsel von Produktionsorganismen aus.

Eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt neben einer Probenahmesonde mit Absperrmitteln ein an die Sonde angekoppeltes bzw. ankoppelbares Probenrohr von ausreichender Länge zur Aufnahmen von Probenserien innerhalb eines gewünschten Zeitraums. Dieses Probenrohr hat insbesondere Absperrmittel an den Enden und wird zweckmäßigerweise am Ende der Probennahmeserie eingefroren. In dieser Form ist eine Unterteilung in gewünschte Einzelproben einfach zu bewerkstelligen.

Die an das Probenrohr angeschlossene bzw. anschließbare Probenahmesonde, die über einen Anschlußstutzen in den Reaktionsraum eingeführt werden kann, wird in an sich bekannter Weise durch ein Doppelrohr gebildet, dessen beide Leitungszüge in enger Nachbarschaft zur Sondenspitze miteinander in Verbindung stehen, wodurch über die Sondenspitze bzw. die Sondenende zutretende Proben unmittelbar daran anschließend mit Inaktivierungsmittel gemischt werden können, so daß eine Inaktivierung innerhalb von 10—20 msec erreicht werden kann. Besonders zweckmäßig erfolgt die Zumischung an einer Erweiterung der Sondenspitze über einen von der Spitze weggerichteten Schrägeinlauf des Inaktivierungsmittels, das vorzugsweise in einem Winkel von 30 bis 60° zur Sondenachse in den erweiterten Sondenraum eintritt, der anschließend an die Zumischstelle mit statischen Mischelementen versehen ist.

Der Zulauf der Probenflüssigkeit (unter Verdrängung der zu Beginn im Probenrohr vorhandenen Sperrflüssigkeit) erfolgt vorzugsweise durch Druckförderung

mittels einer Druckdifferenz, die zwischen dem Reaktionsraum (aus dem die Probe entnommen wird) und dem Probenrohr herrscht. Das Inaktivierungsmittel wird zweckmäßigerweise mittels eines Tauchrohres aus einem abgeschlossenen Inaktivierungsmittelvorrat durch entsprechende Druckaufprägung gefördert, wobei das gewünschte Mischungsverhältnis durch entsprechende Steuerung der Förderdrücke erreicht werden kann. Anstelle der pneumatischen Förderung könnten selbstverständlich auch Pumpen zur Bewegung der Proben- und Inaktivierungsmittelströme vorgesehen sein.

Die beigelegte schematische Zeichnung veranschaulicht die Erfindung anhand eines speziellen Ausführungsbeispiels:

Wie man sieht, greift die Sonde 1 durch einen Anschlußstutzen 2 in der Reaktorwand abgedichtet in einen Reaktionsraum 3, aus dem über die Sondenspitze 4 Proben (insbesondere kontinuierlich) mittels der Druckdifferenz zwischen dem Reaktionsraum 3 und dem Ende 5 des an die Sonde angeschlossenen Probenrohres 6 kontinuierlich oder intermittierend abgezogen werden. Über die Leitung 7 der Sonde 1 wird Inaktivierungsmittel der Erweiterung 8 der Probenahmeleitung der Sonde insbesondere über eine von der Sondenspitze wegweisende Verbindungsleitung zugeführt. Anschließend daran sind statische Mischelemente 9 im Sondenrohr vorgesehen. Die Inaktivierungsmittelleitung 7 steht über ein Ventil 10 mit anschließendem Tauchrohr mit einem abgeschlossenen Inaktivierungsmittelraum 11 in Verbindung, der über eine mit Ventil versehene Leitung 12 auf Förderdruck gebracht werden kann. Das Probennehmerrohr 13 der Sonde 1 steht über ein Ventil 14 ggf. unter Zwischenschaltung eines Ventils 15 mit dem Probenrohr 6 in Verbindung.

Der Probenahme- und Inaktivierungsvorgang gestaltet sich folgendermaßen:

Das Probenrohr ist vor Beginn der Messung mit einer Sperrflüssigkeit (z. B. deionisiertes Wasser) gefüllt. Diese Sperrflüssigkeit wird bei der Probenahme verdrängt. Die Geschwindigkeit der Probenahme wird über den Druckverlust bei der Durchströmung des Probenrohrs bestimmt. Ist das Probenrohr mit inaktivierter Probe gefüllt, so werden beide Ventile am Probenrohr geschlossen, die Probenahme ist beendet. Damit ist der instationäre zeitliche Verlauf der Reaktion im Reaktor räumlich im Probenrohr konserviert.

Zur Analyse wird das Probenrohr von der Probenahmesonde getrennt und die Proben nach Öffnen der Ventile in gewünschter Unterteilung entnommen und analysiert.

Um eine Rückvermischung bei der Probeentnahme zu vermeiden, kann das Probenrohr tiefgefroren werden. Im gefrorenen Zustand werden die gewünschten Probenvolumina aus dem Probenrohr herausgeschnitten und getrennt aufgetaut und analysiert.

Um auch Flüssigkeitsproben mit veränderlichem Gasgehalt reproduzierbar analysieren können, ist dem Reaktionsgemisch im Reaktor ein "Interner Standard" (IS) in definierter Konzentration beigegeben. Der Interne Standard darf durch die Reaktion in seiner Konzentration nicht verändert werden. Der Interne Standard darf die Reaktion nicht beeinflussen.

Das Probenahmesystem ist zweckmäßigerweise komplett sterilisierbar.

Die Probenahmesonde ist insbesondere passend zu Normstutzen (2) ausgeführt.

Ist der Druckverlust im Probenrohr zu hoch, so kann durch Einfügen eines schnell schaltenden Mehrwege-

ventils zwischen Probenahmesonde und Probenrohr dieses in mehrere kürzere Teilstücke aufgeteilt werden.

Eine Möglichkeit zur Verringerung der Rückvermischung stellt die Segmentierung des Probenstroms bei der Probenahme vor Eintritt in das Probennehmerrohr durch periodisches Einspeisen einer zweiten nicht mischbaren flüssigen Phase oder Gasphase (z. B. Luft) mit entsprechender Frequenz in den Probenahmestrom (etwa über 15) dar.

Die Dimensionierung des vorstehend beschriebenen Probenahmesystems richtet sich nach den gewünschten analytischen Aufgaben für die Probenahme. Speziell zur Proben zur Untersuchung zellinterner Komponenten, deren Konzentration sich innerhalb der inaktivierten Probe nicht mehr verändern soll (wobei zusätzlich durch Zumischung von gekühltem Inaktivierungsmittel für ein "Einfrieren" des Entnahmestandes gesorgt werden kann) sind folgende Abmessungen zweckmäßig:

Die Probenleitung 13 der Sonde hat einen Durchmesser von 4 bis 8 mm und endet in einer auf 2 bis 4 mm verjüngten Sondenspitze 4. Vom Probeneinlaß 5 mm entfernt befindet sich die auf 4 bis 8 mm aufgeweitete Mischstelle 8, in welche die Inaktivierungsmittelleitung (Durchmesser 2 bis 4 mm) unter einem Winkel von 30 bis 60° zur Sondenachse mündet. Die Mischelemente 9 sind auf einer Länge von 2 bis 5 cm vorgesehen. Das Probenrohr 6 hat eine Länge von 20 bis 150 m und kann mit einem "Windungs-Durchmesser" von 20 bis 30 cm weitgehend horizontal aufgewickelt sein.

Es folgt ein Beispiel für die Durchführung der erfindungsgemäßen Probenahme:

Beispiel

35 Dynamische Untersuchung des katabolen Stoffwechsels des anaeroben Bakteriums *Zymomonas mobilis*

Mit Hilfe dynamischer Untersuchungen (Aufprägung von Pulsen oder Sprungfunktionen) unter definierten Bedingungen, wie sie im Bioreaktor einstellbar sind, lassen sich "Flaschenhälse" im Stoffwechsel identifizieren. Aus dem dynamischen Verlauf der zellinternen Metabolite können (teil-)strukturierte Stoffwechselmodelle identifiziert werden. Werden solche Untersuchungen innerhalb weniger Minuten durchgeführt, kann der Einfluß einer Regulation auf genetischer Ebene ausgeschlossen werden.

Zur dynamischen Untersuchung des katabolen Stoffwechsels von *Zymomonas mobilis* sind hohe Probenahmefrequenzen erforderlich, da dieses Bakterium in der Lage ist, große Stoffmengen in sehr kurzer Zeit umzusetzen. Die maximale zellmassenspezifische Glucose-Aufnahmegeschwindigkeit von *Zymomonas mobilis* wurde im stationären Zustand zu $q_{s,max} = 144 \text{ mmol Glucose / (g Trockensubstanz} \cdot \text{h)}$ bestimmt (D. Weuster-Botz: Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* in a fluidized bed reactor. Part I. Kinetic studies of immobilization in macroporous glass beads. Appl Microbiol Biotechnol (1993) 39: 679—584). Bei einem durchschnittlichem zellinternem Volumen von 2 ml/g TS bedeutet dies, daß *Zymomonas mobilis* in einer Sekunde 20 mmol/l Glucose aufnehmen kann. Daher sind Meßfrequenzen größer 1/Sekunde erforderlich.

Fermentation

In einem 30 l Rührkesselfermenter (Arbeitsvolumen 20 l, 6-Blatt-Radial-Rührer) mit Standard-Meß- und Re-

gelungstechnik (Drehzahl(n)-, Volumen(V)-, Druck(P)-, Temperatur(T)- und pH-Regelung) wird *Zymomonas mobilis* kontinuierlich bei einer Verweilzeit von 10 h im Fließgleichgewicht kultiviert (Glucose im Zulauf = 120 g/l, pH = 5,0, T = 30°C). Dabei läßt sich eine Zelldichte von 1,8 g TS/l erzielen. Die Glukosekonzentration im Fermenter beträgt 0,08 g/l, die Produktkonzentration (Ethanol) 55 g/l. Es sind also Glucose-limitierte Bedingungen eingestellt ($K_S = 0,13$ g/l). Die Mediumszusammensetzung (rein mineralisches Medium) ist in der Literatur angegeben (siehe oben).

Zusätzlich wird als Interner Standard (IS) 20 µmol/l Maltose ins Medium eingewogen. Maltose kann von *Zymomonas mobilis* nicht aufgenommen werden.

Schnelle Probenahme mit Inaktivierung

In einem seitlichen 25 mm "Ingold"-Stutzen des Standard-Rührkesselfermenters befindet sich die Probenahmesonde, die bei der Sterilisation des Fermenters mitsterilisiert wird. Das Ventil zur Zuführung des Inaktivierungsreagenz und das Ventil am Probenrohr sind geschlossen. Das Probenrohr aus Polypropylen hat einen Durchmesser von 8 mm, eine Länge von 80 m und ist mit einem Durchmesser von 25 cm aufgewickelt (100 Wicklungen). Als Sperrflüssigkeit wird Wasser verwendet.

Im Reaktor ist in axialer Richtung über die gesamte Eintauchtiefe ein perforiertes Tauchrohr angebracht, das ebenfalls über ein Ventil abgeschlossen ist. Daran angeschlossen ist eine Vorlage mit 100 ml Glukosekonzentrat (400 g/l). Der Druck im Vorlagebehälter beträgt 4-bar. Mit dieser Anordnung lassen sich bei Öffnen des Ventils zur Aufgabe eines Glukose-Pulses bei maximaler Rührerdrehzahl ($n = 1000$ l/min) Mischzeiten von weniger als 100 ms erzielen. Die Konzentration an Glukose im Fermenter beträgt direkt nach Aufgabe des Glukosepulses 2,0 g/l (nicht glucoselimitierte Bedingungen).

Der Vordruck im Fermenter zum Transport der Probe in das Probenrohr wird bei dem gewählten Rohrdurchmesser von 8 mm auf 400 mbar eingestellt. Die Perchlorsäurevorlage (35%ige Lösung) wird auf -25°C gekühlt und ebenfalls mit einem Vordruck von 400 mbar beaufschlagt.

Der Probenahme- und Inaktivierungsvorgang gliedert sich in 5 Phasen:

1. Starten der Probenahme durch zeitgleiches Öffnen der Ventile an der Probenahmesonde und am Probenrohr (Ausgangskonzentrationen).
2. Aufgeben eines Glukosepulses nach 20 Sekunden durch Öffnen des Ventils der Glukosevorlage (die Messungen im Bereich der Mischzeit können später bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden).
3. Beenden der Probenahme nach 5 Minuten durch Schließen aller Ventile, wenn das Probenrohr vollständig mit Probe gefüllt ist.
4. Abtrennen des Probenrohrs von der Probenahmesonde und Einfrieren des Probenrohrs.
5. Zerlegen des gefrorenen Progenahmerohrs in äquidistante Teilstücke von 5 ml Inhalt. Nach dem Auftauen können die Teilproben analysiert werden.

Ergebnis

Bei dieser Vorgehensweise wird ein inaktivierter Probenahmestrom von 15 ml/s erzielt. Das bedeutet, die

zeitliche Auflösung liegt bei 3 Proben/Sekunde, es wird also eine Meßzeit von 333 ms erzielt. Durch die Probenahme wird das Reaktorvolumen um 2,25 l verringert (11,25%).

Durch Analyse des Internen Standards läßt sich das Mischungsverhältnis Probe und Inaktivierungsreagenz im Rahmen der Meßgenauigkeit bestimmen.

Die Analytik der einzelnen Stoffwechselintermediate erfolgt nach Vorbehandlung der Probe (abzentrifugieren bei 30 000 g, 30 min, 4°C und Lyophilisieren des Überstands) in der Regel biochemisch. Die Konzentrationen der phosphorylierten Verbindungen, wie sie im katabolen Stoffwechselweg überwiegend vorliegen, können in einfacher Weise mit Hilfe von ^{31}P -NMR-Messung der Perchlorsäureextrakte gleichzeitig bestimmt werden.

Mit dieser Technik kann der dynamische Konzentrationsverlauf von Glucose-6-P, 6-P-Gluconat, 2-keto-3-deoxy-6-P-Gluconat, Glyceraldehyd-3-P, Glycerate-1,3-P, 3-P-Glycerate, 2-P-Glycerate, ATP, ADP, UTP, UDP gemessen werden.

Bei bekanntem intrazellulärem Volumen (*Zymomonas mobilis* 2 ml/g TS) lassen sich daraus die intrazellulären Konzentrationen berechnen.

Die intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite, die auch extern vorliegen (Glucose, Lactat, Acetat, Ethanol, Glycerin, Acetoin, Acetaldehyd) können aufgrund des ungünstigen Volumenverhältnissen intern/extern nicht bestimmt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufs von Bioreaktionen in einem Reaktionsraum durch aufeinanderfolgende Entnahme biologischer Proben daraus unter Zumischung von Inaktivierungsmittel am Probenahmeort mit einer als Doppelrohr ausgebildeten Probenahmesonde, dadurch gekennzeichnet, daß man die aufeinanderfolgenden Proben in zumindest ein mit Sperrflüssigkeit gefülltes Probenrohr von ausreichender Länge zur Aufnahme der Probenserie unter Verdrängung der Sperrflüssigkeit schickt, das nach Beendigung der Serienprobenahme - ggf. eingefroren - entsprechend der gewünschten Zeitunterteilung der Untersuchungsproben in einzelne Abschnitte zerteilt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Reaktionsraum vor Beginn der Probenahme eine inerte Komponente als innerer Standard homogen zugemischt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß während der Probenahme periodisch geringe Segmentierungsmengen einer nicht mischbaren Phase in das Probenrohr eingespeist werden.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge und der Durchmesser des oder der Probenrohre(s) ausreichend bemessen sind für die Analyse des Konzentrationsverlaufs zellinterner Komponenten.
5. Vorrichtung zur Entnahme biologischer Proben aus einem Reaktionsraum mittels einer Probenahmesonde mit Absperrmitteln, gekennzeichnet durch ein an die Sonde angekoppeltes bzw. ankoppelbares Probenrohr von ausreichender Länge zur Aufnahme einer Probenserie über einen dem zeitli-

chen Reaktionsablauf entsprechenden Zeitraum.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch Absperrmittel an den Probenrohrenenden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, gekennzeichnet durch eine in den Reaktor einpaßbare 5
rohrförmige Probenahmesonde mit zum Reaktionsraum offener Entnahmespitze, in deren Erweiterung eine Parallelbohrung für die Zufuhr von Inaktivierungsmittel mündet und die angrenzend an diese Einmündung mit statischen Mischelementen 10
versehen ist sowie durch Mittel zur Erzeugung abgestimmter Förderdrucke für die Proben- und Inaktivierungsmittelströme.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, gekennzeichnet durch pneumatischen Antrieb von Proben- und Inaktivierungsmittelstrom. 15

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, gekennzeichnet durch einen um $30-60^\circ$ gegen die Sondenachse geneigten Einlauf des Inaktivierungsmittels. 20

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

BEST AVAILABLE COPY

